



TITLE:

心臓外科領域における  
microfluorometryの応用 1.  
Microfluorometryによる心筋  
Viabilityの判定

AUTHOR(S):

千葉, 幸夫

---

CITATION:

千葉, 幸夫. 心臓外科領域におけるmicrofluorometryの応用 1. Microfluorometryによる心筋Viabilityの判定. 日本外科宝函 1982, 51(2): 307-314

ISSUE DATE:

1982-03-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/208932>

RIGHT:

# 心臓外科領域における microfluorometry の応用

## 1. Microfluorometry による心筋 Viability の判定

京都大学医学部外科学教室第2講座（指導：日笠頼則教授）

千葉 幸 夫

〔原稿受付：昭和57年1月8日〕

## Application of Microfluorometry to Cardiovascular Surgery

### I. Evaluation of the Viability of Myocardium by Microfluorometry

YUKIO CHIBA

The 2nd Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University  
(Director: Prof. Dr. YORINORI HIKASA)

An on-line, non-invasive method of monitoring the viability of myocardium in cardiac ischemia is described in this report. The technique is based on the differences in spectrol properties between the oxidized and reduced forms of pyridine nucleotides. Mitochondrial NADH fluorescence is an efficient indicator of intracellular oxygen concentration and changes in metabolic condition.

Under total cardiopulmonary bypass, the fluorescent emission from the surface of the canine hearts (RV epicardium) was monitored. As soon as the aorta was clamped, the fluorescence was increased promptly and reached a plateau. Experimental results obtained at declamping after 90 minutes' continuous myocardial ischemia were as described below. In hypothermia (20°C) the fluorescence returned to the pre-clamping level promptly, and the heart recovered normal beating. In normothermia (36°C), the fluorescence decreased slowly, but not to the pre-clamping level and the heart showed only feeble fibrillation.

From the extent of decrease of the NADH fluorescence at reperfusion, four grades of viability of myocardium in cardiac ischemia were classified.

Grade 1: viability is excellent

At reperfusion, the fluorescence returns to the pre-clamping level within one minute.

Grade 2: Viability is good

Key words: Fluorometry, Viability of myocardium, Myocardial metabolism, Myocardial protection, Mitochondrial redox state.

索引語：螢光測定法，心筋バイアビリティ，心筋代謝，心筋保護，ミトコンドリア酸化還元状態，

Present address: The 2nd Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto. 606, Japan.

At reperfusion, the fluorescence returns to the pre-clamping level within two minutes.

Grade 3: Viability is poor

At reperfusion, the fluorescence decreases, but not to the pre-clamping level. (the decrease is more than a half to the pre-clamping level)

Grade 4: Viability is damaged

At reperfusion, the fluorescence decreases only scarcely. (the decrease is less than a half to the pre-clamping level)

### はじめに

開心術中の心筋組織灌流の状態や、心筋細胞自身の呼吸代謝の状態をより良く反映する指標となるものを、心臓外科医は追求して来た。従来より、組織灌流や細胞自身の呼吸代謝を評価する方法として、血行動態面から心機能を検討する方法と、細胞レベルでの Viability を評価する方法が行なわれて来ており、後者としては、血液採取による代謝産物や逸脱酵素の測定<sup>16, 20)</sup>、切除心筋組織の生化学的定量、あるいは電顕による超微細構造<sup>12)</sup>の変化などを検索する方法が中心であった。しかしながら、呼吸代謝系は、元来動的なシステムであり、たえず生体内で変化しているものである。血液採取や、切除組織から個々の要素の変化を調べて、それらを組み合わせ、再構築するのではなく、動的なシステムの変化を、リアルタイムに、なおかつ非破壊的に測定する方法こそが、理想的評価法と考えられる。現在のところ、この要求を満たす唯一の方法は、Chance<sup>5)</sup> らによって紹介された、Fluorometry 法による細胞内 pyridine nucleotide の redox state の測定であろう<sup>17, 24)</sup>。還元型の pyridine nucleotide (NADH) は波長 340 nm に極大吸収を持ち、吸収エネルギーの一部は 460 nm を極大とする螢光を発するが、酸化型の pyridine nucleotide (NAD) は螢光を発しない (図 1)。それゆえ一定量の励起紫外線を目標組織に照射して発生する螢光量を測定すれば、その組織内の pyridine nucleotide の redox state に対応して螢光量が変化するので、測定し得た螢光量をもって、その組織の redox state の指標とすることが出来る。

従来この方法は、血液が灌流する in situ の組織では、赤血球や、循環血流量の変動にもとずく、血行性アーティファクト<sup>24)</sup>のために測定が困難であったが、小林ら<sup>20, 21)</sup> が開発した新しい microfluorometry 法はこの障害を解決し、in situ の臓器に対する応用を可能とした。著者はこの点に着目して、この microfluoro-

metry 法を心臓に対して使用し、心筋に対する血流遮断時と血流再灌流時における変化と、その再現性に関する実験を行ない、心筋の Viability の判定に利用可能であるか否かを検討した。

### 方 法

体重 10~16 kg の雑種成犬 30 頭を用い、0.4 ml/kg のソムノベンチルで静脈麻酔後、気管内挿管を行ない、Harvard 型レスピレーターに接続、room air による間歇的陽圧呼吸を行なった。第 4 肋間にて、胸骨横断による両側開胸を行ない、送血管を右総頸動脈に、脱血管を右心耳より右房に挿入し、体外循環下に実験を行なった。人工心肺装置は、ローラー型ポンプと、テンプトロール Q110 人工肺を使用、充填液として、乳酸リンゲル液、7%重炭酸ソーダ液、カルシウムグルコネート、及び20%マニトールを加えたものを使用し、灌流量は 80 ml/kg とした。心筋温度計はテルモ社製を使用し、左室心尖部に、針型プローブを穿刺して連続的に測定した。

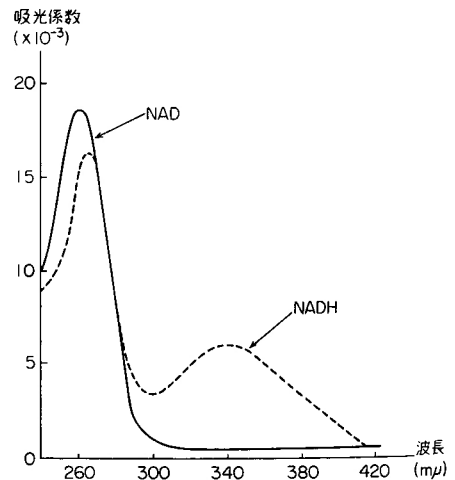


図 1 NAD NADH の吸光スペクトル

体温および血液温は、プローブを直腸（咽頭）または、人工肺リザーバーに直接挿入し、テルモ社製温度計で測定した。

右心室前壁の心外膜表面に、測光プローブを、アロニアルファにて貼付装着し、これに直径 3 mm, 長さ 70 cm のグラスファイバーをつないで、立石ライフサイエンス研究所製の Redoximeter に接続した。励起紫外線、発生蛍光は、このグラスファイバー内を通して、Redoximeter から組織へ、組織から Redoximeter に伝えられる。

次のような条件下で、蛍光量の変化を測定した。

- ① 常温下（心筋温  $34^{\circ}\text{C}\sim 37^{\circ}\text{C}$ ）において、上行大動脈を遮断。90分後に血流を再開する。
- ② 低温下（心筋温  $20^{\circ}\text{C}\sim 24^{\circ}\text{C}$ ）において、上行大動脈を遮断。90分後に血流を再開する。
- ③ 常温下で大動脈遮断後、30分毎にローラーポンプで約2分間の血液再灌流を行なう。
- ④ 低温下で大動脈遮断後、30分毎に、ローラーポンプで約2分間の血液再灌流を行なう。

①～④の条件下で、360 nm の紫外線を、右室心筋表面に照射し、励起される蛍光（460 nm）量を、フィルターを通して測定記録した。この際、720 nm の近赤外反射光を測定し、心筋内に含まれる血液によって生ずる蛍光変化の補正を行なっている。蛍光の測定は、蛍光の入射口を閉じた状態を 0%, 非虚血心筋における生理的状态での蛍光量を 100% として示した。なお

常温下測定では、生理食塩水を輸血用のウォーマーコイルを通して加温し、心のう内に注入して心筋温を維持し、一方低温下測定では、生理食塩水で作った ice slush を用いる局所冷却法により心筋温を調整した。

## 結 果

- ① 常温下（心筋温  $34^{\circ}\text{C}\sim 37^{\circ}\text{C}$ ）において、上行大動脈を遮断、90分後に血流を再開した場合

大動脈遮断により蛍光量は急激に増加し、平均2分で180%に達し、以後プラトーとなった。90分後に大動脈遮断を解除して血流を再開すると、蛍光は再び減少するが、その減少速度は遅く、平均160%までの減少にとどまった。心筋は堅く、外観上暗赤色を示し、いわゆる「stone heart」の様相を呈し、直流除細動によっても正常心拍動の再開をみなかった（図2下）。

- ② 低温下（心筋温  $20^{\circ}\text{C}\sim 24^{\circ}\text{C}$ ）において、上行大動脈を遮断、90分後に血流を再開した場合

大動脈遮断により、蛍光量は急激に増加し、平均2分で、180%に達し、プラトーとなった。90分後の血流再開により、蛍光量は瞬時に減少し、100%の基線に戻った。心筋は、大きな心室細動を示し、直流除細動により容易に正常心拍動をとり戻した（図2上）。

- ③ 常温下で大動脈遮断後、30分毎に約2分間の血液再灌流を行なった場合

大動脈遮断後、蛍光量が180%でプラトーとなるが、30分後の血液再灌流では、蛍光量は瞬時に減少し、

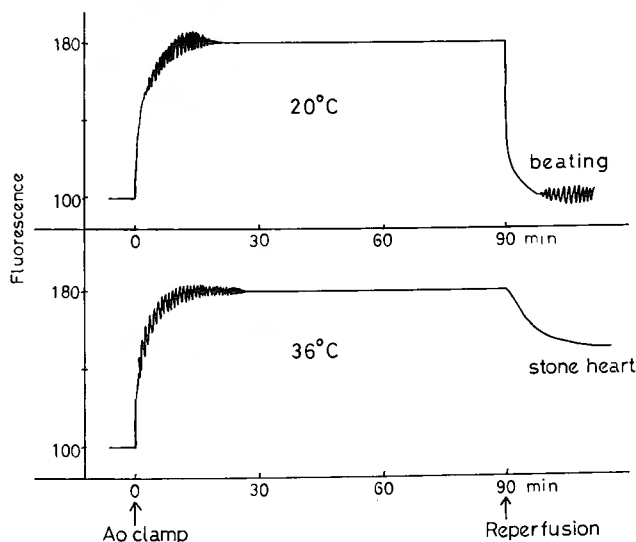


図2 大動脈遮断後1分以内に心室細動となり、次第に減弱して完全に心停止となる。常温下で、心室細動が続く。

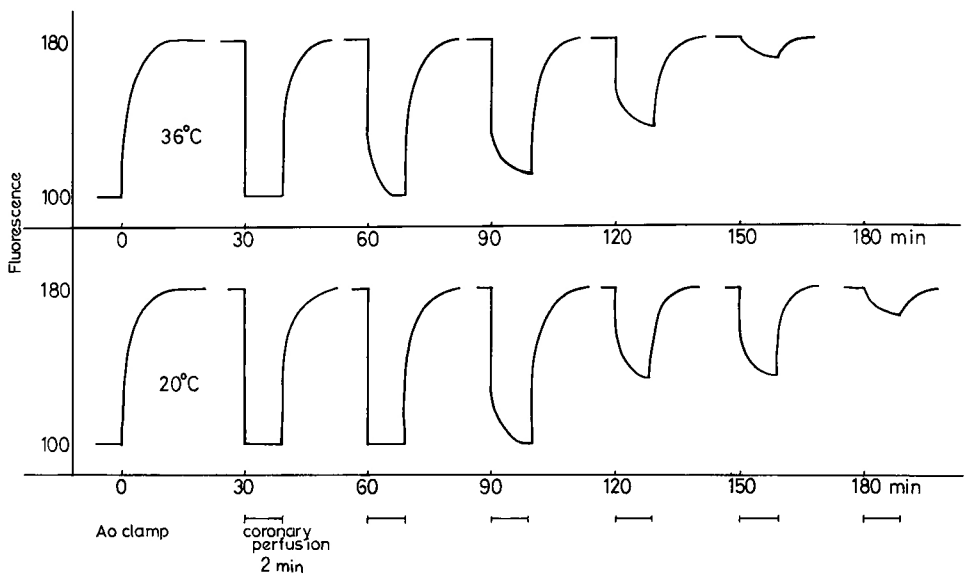


図 3

100%に戻った。60分後の血液再灌流では、蛍光量は100%まで減少するが、平均1分30秒を要した。90分、120分後の2分間の血液再灌流では、蛍光量は、各々110%、140%までしか減少しなかった。150分後の血液再灌流では、蛍光量の減少は軽微で、約10%の減少にとどまった（図3上段）。

④ 低温下で大動脈遮断後、30分毎に、約2分間の血液再灌流を行った場合

大動脈遮断後、蛍光量が180%でプラトーに達した後、30分後、60分後の血液再灌流では、蛍光量は瞬間

に減少し、数秒以内に100%の基線に戻った。90分後の血液再灌流では、蛍光量は100%に戻るが、平均1分30秒を要した。120分後、150分後の血液再灌流では、蛍光量は、140%の減少にとどまった。180分後の血液再灌流では、蛍光量の減少は軽微で、約30%の減少のみであった（図3下段）。

なお、常温下で大動脈遮断を行ない、30分毎に血液再灌流した場合（条件③）、120分迄の血液再開では、心室細動はしだいに強大となり、直流除細動にて正常心拍動をとり戻すことができたが、150分以後は、細動

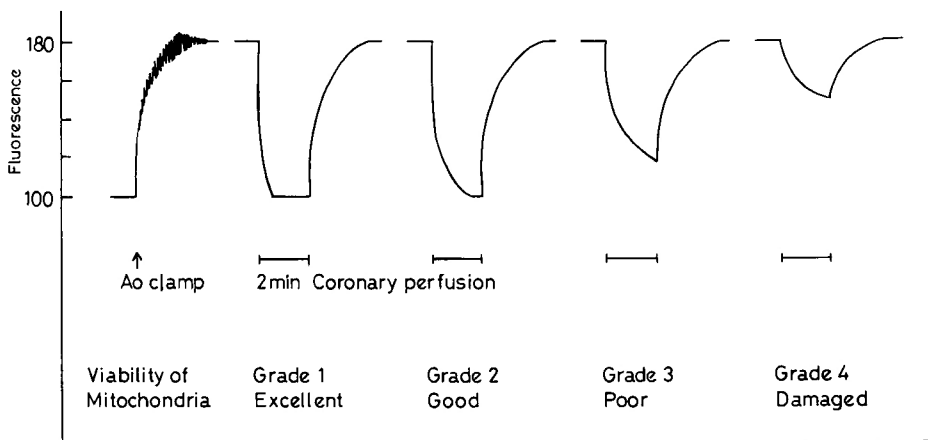


図 4

も微弱で、いわゆる「stone heart」の様相を呈した。低温下大動脈遮断で、30分毎に血液再灌流を行なった場合（条件④）、150分迄の血液再開では、心室細動は強大で、直流除細動にて容易に正常心拍動をとり戻すことができたが、180分後以後は、細動は微弱であった。

## 考 察

一連の実験を通して、大動脈遮断による虚血心停止中、間歇的血液再灌流、または血流再開時の蛍光量の変化が、心筋の Viability を示す指標となり得ることが明らかとなった。

この蛍光量の変化のパターンから、心筋細胞の Via-

bility を次の4段階に分類した<sup>9)</sup>（図4）。

### Grade 1. Excellent

Viability は極めて良好。蛍光量は1分以内に基線に復する。

### Grade 2. Good

Viability は良好。蛍光量は2分以内に基線に復する。

### Grade 3. Poor

心筋細胞は軽度障害。2分間の灌流で、140%以下に蛍光量は減少するが、100%の基線には戻らない。

### Grade 4. Damaged

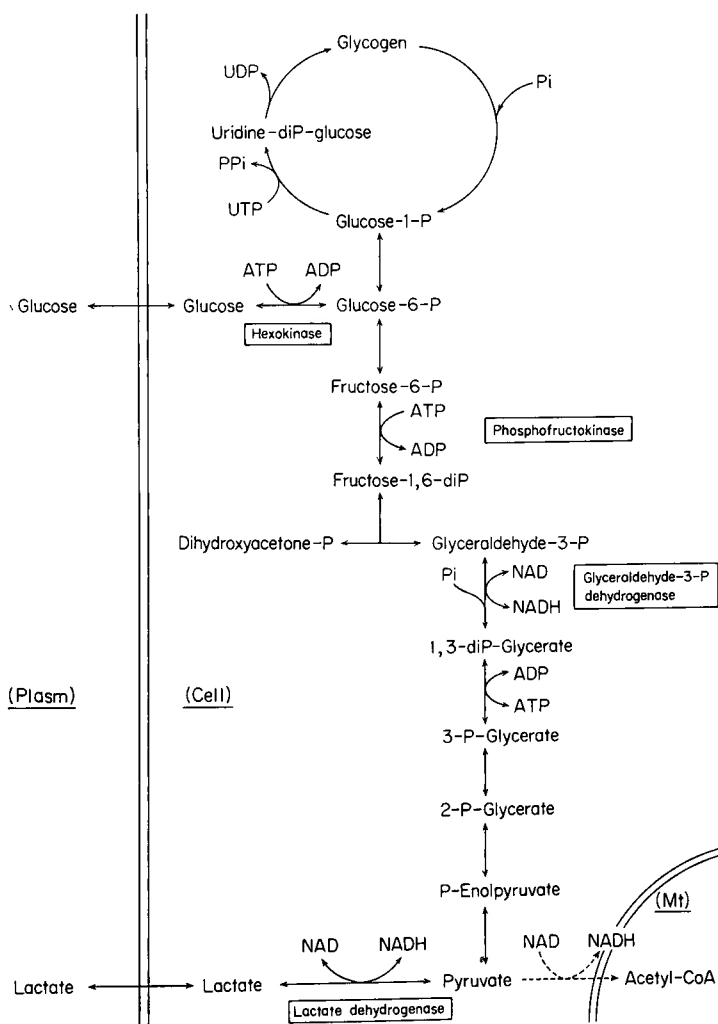


図5 解糖系

心筋細胞は高度障害. 2 分間の灌流でも, 螢光量の減少は軽微で, 140%以上にとどまる.

なお, 直流徐細動法によって正常心拍動をとり戻すには, 螢光量の変動は Grade 3 で, 130%以下に減少していることが, 必要であった.

ところで, 心筋は好気性代謝に依存するところが大きく<sup>14)</sup>, 低酸素状態では正常な心機能を維持することはできない. 心筋はエネルギーを産出するためにいろいろな基質を利用しているが, その中には glucose, 遊離脂肪酸, lactate と pyruvate があり, アミノ酸などはあまり利用されない.

炭水化物の代謝は, 細胞質で行なわれ, 図5に示すように, 1モルの glucose は, 2モルの pyruvate となり, 更に2モルの lactate に分解される. この glucose から lactate までの全過程において酸素は使用されない.

ただ, 2つの過程で, 酸化還元反応が行なわれる. すなわち, glyceraldehyde が 1,3-diphosphoglyceric acid に酸化され, pyruvate が lactate に還元される. いずれの場合も, pyridine nucleotide (NAD, NADH) が関与し, 結果的に, 酸化も還元も行なわれない. またエネルギー産生については, glucose が, glucose-6-phosphate に, fructose-6-phosphate が fructose-1,6-diphosphate になる2つの過程で (phosphoriration) で, 計2モルの adeninetriphosphate (ATP) が消費されるが, 1,3-diphosphoglyceric acid が 3-phosphoglyceric

acid に, また phosphopyruvic acid が pyruvate になる反応で, 計4モルの ATP が産生される結果, 全体として2モルの ATP が産出される.

好気的条件下では, pyruvate は acetyl-CoA および oxaloacetic acid となり, ミトコンドリア内で, Krebs cycle に入る (図6). pyruvate から acetyl CoA, isocitric acid から  $\alpha$ -Ketoglutaric acid,  $\alpha$ -Ketoglutaric acid から succinyl CoA, malic acid から oxaloacetic CoA になる過程で, NAD が NADH に還元される. また, Succinic acid が fumaric acid になる時には, FAD が FADH<sub>2</sub> となり, さらに, succinyl CoA が succinic acid になる際, GDP が GTP へとリン酸化が行なわれ, 1モルの ATP が産生される.

このように生じた4モルの NADH と1モルの FADH<sub>2</sub> はミトコンドリアの電子伝達系で酸化され, 14モルの ATP が産生される.

結局, 1モルの glucose が好気性代謝で, 完全燃焼され CO<sub>2</sub> と H<sub>2</sub>O に分解される時に, 38モルの ATP が産生されることになる.

ところが, 嫌気的条件下<sup>23)</sup>では, pyruvate は acetyl CoA からミトコンドリアへ入ることが出来ず, lactate に進む結果, 産生される ATP はわずかに2モルのみである. このように, 心筋が収縮を行うために必要なエネルギーを得るためには好気性代謝が絶対に必要である.

細胞内にとり込まれた酸素の90%以上は, ミトコン

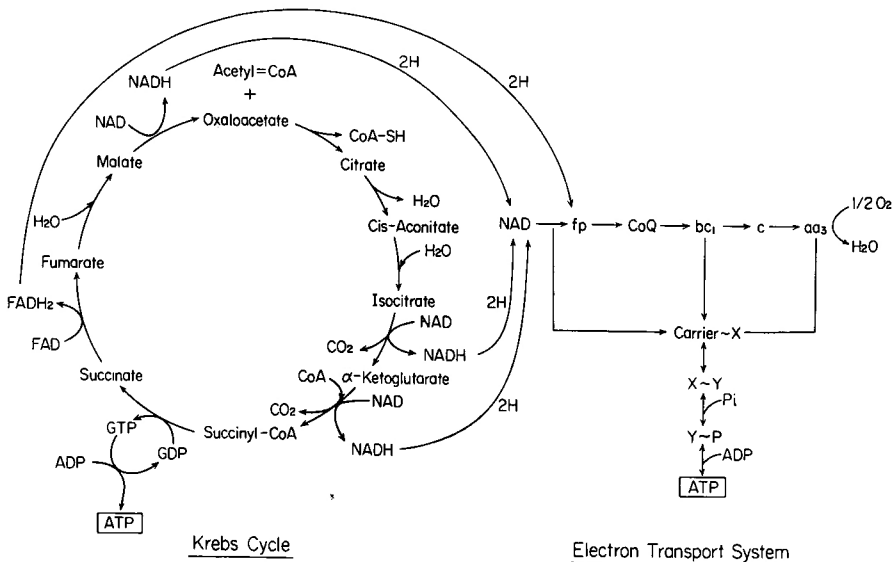


図 6

ドリアの電子伝達系で、NADH, FADH<sub>2</sub> を酸化するために利用される<sup>22)</sup>。この NAD/NADH 比を知ることにより、その細胞の酸化還元状態 (redox state) を察知することが可能である<sup>9)</sup>。

lactate dehydrogenase 系は細胞質内での [NAD<sup>+</sup>]/[NADH] を反映し、 $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase 系はミトコンドリア、クリスタの [NAD<sup>+</sup>]/[NADH] を、glutamate dehydrogenase はミトコンドリア、マトリックスの [NAD<sup>+</sup>]/[NADH] を反映しており、これらの反応系での平衡定数を求めると、それぞれの [NAD<sup>+</sup>]/[NADH] が判かる。ほぼ生理的状態での rat liver では細胞質内での [NAD<sup>+</sup>]/[NADH] は、平均 725、ミトコンドリア内では、クリスタ、マトリックスもほぼ同じで、[NAD<sup>+</sup>]/[NADH] は平均 8 であり、このことからミトコンドリア内では細胞質と比べて非常に還元状態にあると考えられる<sup>33)</sup>。NAD, NADH はミトコンドリア膜を容易に通過することが出来ない。(Shuttle 機構)<sup>4), 19), 28)</sup>、それ故、このような異った酸化還元状態が保たれるわけである。

ところで、Fluorometry 法で得られる蛍光は、還元型の NAD および NADP、すなわち NADH, NADPH から発せられるが、NADP は生体内ではほとんど還元型 NADPH として存在するとされており、本実験でみられるような蛍光量の急激な変化は、NAD の redox state の変化と考えられる<sup>7)</sup>。しかも先述したように、細胞内の NAD は細胞質とミトコンドリアの 2つの区画に分けられ、NAD はミトコンドリア膜を容易に通過し得ない。量的にはミトコンドリアにはるかに多く存在していることから、Fluorometry 法によって得られる情報は、主としてミトコンドリア内の redox state を表わしていると考えられる。

心臓手術において、無血視野で、しかも静止した状態で、正確にかつ迅速に手術操作を行なえることが術者の願いであった。このため、大動脈遮断による一時的虚血、電気的細動、超低体温法<sup>25)</sup>、局所冷却法<sup>3, 15, 31)</sup>、薬物による心停止法およびその間の心筋保護法<sup>8, 11, 13, 19, 26, 27, 30)</sup>が行なわれて来た。しかし、これらの心停止中の心筋保護手段の安全性や許容時間については、明確な指標もなく経験的に行なわれて来たのが現状である。

この実験を通して、虚血による心停止状態での心筋の Viability を約 2 分間の冠灌流時の蛍光の変化のパターンから real time で、かつ非破壊的に知ることが可能であることがわかった。その他にも、Fluorometry

法は、急性心筋梗塞後の緊急手術に際し、心筋梗塞巣の範囲を知る目的や、術中、術直後の心筋梗塞の発見、A-C バイパスの有効性を知る目的などに応用が可能である。とくに fluorescence photography<sup>1, 2)</sup> は、今後臨床に充分使用できるであろうと考える。

## 結 論

還元型の pyridine nucleotide は波長 340 nm に極大吸収を持ち、吸収エネルギーの一部は 460 nm を極大とする蛍光を発するが、酸化型の pyridine nucleotide は蛍光を発しない。それゆえ、一定量の励起紫外線を照射して蛍光量を測定すれば、その組織内の pyridine nucleotide の redox state に対応して蛍光量が変化するので、その蛍光量をもって、その組織の redox state の指標とすることが出来る。この方法を利用して、大動脈遮断による虚血心停止中、30分毎に 2 分間の血液灌流を行ない、その時の蛍光量の変化のパターンから、心筋の Viability を次の 4 段階に分類した。

### Grade 1. Excellent

Viability は極めて良好。蛍光量は 1 分以内に基線に復する。

### Grade 2. Good

Viability は良好。蛍光量は 2 分以内に基線に復する。

### Grade 3. Poor

心筋細胞は軽度障害。2 分間の血液灌流で、140% 以下に蛍光量は減少するが 100% の基線に戻らない。

### Grade 4. Damaged

心筋細胞は高度障害。2 分間の血液灌流でも蛍光量の減少は軽微で、140% 以上にとどまる。

本論文の要旨は、第 8 回 World Congress of Cardiology (東京, 1978)、第 1 回、代謝コロキウム(京都 1979)において発表した。

稿を終えるにあたり、終始御指導を頂き、且つ御校閲を賜りました恩師日笠頼則教授、並びに御指導、御教示を頂きました龍田憲和講師に深く感謝の念を表します。また御教示を頂きました大頭信義先生、立石ライフサイエンス研究所、小林茂樹所長に厚く御礼申し上げます。

## 参 考 文 献

- 1) Barlow CH, Chance B: Ischemic areas in perfused rat hearts: Measurement by NADH fluorescence photography. *Science* **193**: 909-910, 1976.
- 2) Barlow CH, Harken AH, et al: Evaluation of



- cardiac ischemia by NADH Fluorescence photography. *Ann Surg* **186**: 737-740, 1977.
- 3) Barner HB, Standeven JW, et al: Topical cardiac hypothermia for myocardial preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* **73**: 856-867, 1977.
  - 4) Boxer GE, Devlin TM: Pathways of intracellular hydrogen transport. *Science* **134**: 1495-1501, 1961.
  - 5) Chance B, Cohen P, et al: Intra cellular oxydation-reduction state in vivo. *Science* **137**: 499-508, 1962.
  - 6) Chance B: Pyridine nucleotides as an indicator of the oxygen requirement for energy-linked functions of mitochondria. *Chic Res* **38** (Suppl 1): I-31-38, 1976.
  - 7) Chapman J: Fluorometric studies of oxidative metabolism in isolated pappillary muscle of the rabbit. *J Gen Physiol* **59**: 135-154, 1972.
  - 8) Codd JE, Wiens RD, et al: Steroids and myocardial preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* **74**: 418-422, 1977.
  - 9) 大頭信義, 龍田憲和, 他: 開心術時の心筋保護研究に対する Redoxmeter の応用について. *医用電子と生体工学* **16** (特別号): 304, 1978.
  - 10) Danforth WH, Naegle S, et al: Effect of ischemia and reoxygenation on glycolytic reaction and adenosinetriphosphate in heart muscle. *Circ Res* **8**: 965-971, 1960.
  - 11) Engedal H, Skagseth E, et al: Effects of procaine-induced cardioplegia on myocardial ischemia, myocardial edema, and postarrest ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg* **75**: 886-891, 1978.
  - 12) Ferrans VJ: Morphological methods for evaluation of myocardial protection. *Ann Thorac Surg* **20**: 11-20, 1975.
  - 13) Follette D, Mulder D, et al: Prolonged safe aortic clamping by combining membrane stabilization, multidose cardioplegia, and appropriate pH reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* **74**: 682-694, 1977.
  - 14) Green DE, Goldberger RF: Pathways of metabolism in heart muscle. *Am J Med* **30**: 666-678, 1961.
  - 15) Griep RB, Stinson EB, et al: Profound local hypothermia for myocardial protection during open-heart surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* **66**: 731-742, 1973.
  - 16) Huckabee WE: Relationships of pyruvate and lactate during anaerobic metabolism I. Effects of infusion of pyruvate or glucose and of hyperventilation. *J Clin Invest* **37**: 244-254, 1958.
  - 17) Jöbsis FF, Duffield JC: Oxidative and glycolytic recovery metabolism in muscle, fluorometric observation on their relative contributions. *J Gen Physiol* **50**: 1009-1047, 1967.
  - 18) Katz AM: *Physiology of the Heart*, New York, Raven Press 1977, p. 58-62.
  - 19) Kirsh U, Rodewald G, et al: Induced ischemic arrest. clinical experience with cardioplegia in open-heart surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* **63**: 121-130, 1972.
  - 20) Kobayashi S, Kaede K, et al: Microfluorometry of oxydation-reduction state of the rat kidney in situ. *J Appl Physiol* **31**: 693-696, 1971.
  - 21) 小林茂樹: 呼吸代謝の in vivo 調節直読法, *生物物理* **14**: 226-237, 1974.
  - 22) Mela LM: 健康な人とショック患者の酸素の役割, *The Organ in Shock*, 東京, 日本アップジョン株式会社 1980, p. 8-15.
  - 23) Michal G, Naegle S, et al: Metabolic changes in heart muscle during anoxia. *Am J Physiol* **197**: 1147-1151, 1951.
  - 24) Mills SA, Jöbsis FF, et al: A fluorometric study of oxidative metabolism in the in vivo canine heart during acute ischemia and hypoxia. *Ann Surg* **186**: 193-200, 1977.
  - 25) Mori A, Muraoka R, et al: Deep hypothermia combined with cardiopulmonary bypass for cardiac surgery in neonates and infants. *J Thorac Cardiovasc Surg* **64**: 422-429, 1972.
  - 26) Nayler WG, Fassold E, et al: Pharmacological protection of mitochondrial function in hypoxic heart muscle: Effect of verapamil, propranolol and methylprednisolone. *Cardiovasc Res* **12**: 152-161, 1978.
  - 27) Nayler WG, Yopez C, et al: Protective effect of methylprednisolone sodium succinate on the ultrastructure and resting tension of hypoxic heart muscle. *Cardiovasc Res* **12**: 91-98, 1978.
  - 28) Nishiki K, Erecińska M, et al: Energy relationships between cytosolic metabolism and mitochondrial respiration in rat heart. *Am J Physiol* **234**: c-73-81, 1978.
  - 29) Olson RE: "Excess Lactate" and anaerobiosis. *Ann Int Med* **59**: 960-963, 1963.
  - 30) Reidemeister JC, Heberer G, et al: Induced cardiac arrest by sodium and calcium depletion and the application of procaine. *Int Surg* **47**: 535-542, 1967.
  - 31) Rosenfeldt FL and Watson A: I. Development of an in vitro model of myocardial cooling. A study of the effect of cardiac size on cooling rate. *Ann Thorac Surg* **27**: 7-12, 1979.
  - 32) Scheuer J: Myocardial metabolism in cardiac hypoxia. *Am J Cardiol* **19**: 385-392, 1967.
  - 33) Williamson DH, Lund P, et al: The redox state of free nicotinamideadenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem J* **103**: 514-527, 1967.